

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de la microbiota subgingival en gatos y su asociación con las enfermedades periodontales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Leire Pérez Salcedo**

Directores

David Herrera González  
Mariano Sanz Alonso

**Madrid, 2016**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Departamento de Estomatología III

Facultad de Odontología



***ESTUDIO DE LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN  
GATOS Y SU ASOCIACIÓN CON LAS ENFERMEDADES  
PERIODONTALES***

***Leire Pérez Salcedo***

Tesis doctoral dirigida por

**Prof. Dr. D. David Herrera González**

**Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso**



A mis padres, Mario y Jaime



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis maestros y mentores profesionales:

Prof. David Herrera,

Como co-director de esta tesis, y mucho más, ya que sin él todo este trabajo habría sido imposible y probablemente nunca hubiera llegado a donde está. Las palabras se quedan cortas para expresar mi enorme gratitud y admiración.

Prof. Mariano Sanz,

Como co-director de esta tesis, gracias por guiarme durante todo el máster, por ayudarme a superar mis inseguridades y por ser un ejemplo a seguir.

A todos mis profesores del máster, de los que de todos y cada uno de ellos he aprendido y me han enseñado con gran dedicación.

Quiero también agradecer a todos los que han colaborado en este largo trabajo:

A Mamen, que cada vez que la he necesitado siempre ha estado dispuesta a ayudarme, y por todo su apoyo durante todos estos años.

A Ana O'Connor e Itziar González que son las chicas del laboratorio, gracias a ellas aprendí mientras me divertía.

A María Sánchez Beltrán, por toda su ayuda a entender la PCR, y toda su paciencia conmigo.

A Estefanía Laguna, por sus largas jornadas en el laboratorio procesando muestras.

Por último quiero agradecer a toda mi familia por todo su apoyo, durante el largo camino que empecé al decidir este camino. Y en especial a Mario, por su apoyo incondicional y su palabras de ánimo.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. Prefacio	9
II. Resumen	11
III. Introducción	13
1. Enfermedades periodontales: concepto y prevalencia	
1.1 Enfermedades periodontales en humanos	
1.2 Enfermedades periodontales en felinos	
2. La placa bacteriana como biofilm	
3. Patógenos periodontales en felinos y humanos	
3.1 Especies bacterianas negro-pigmentadas en humanos	
3.2 Especies bacterianas negro-pigmentadas en felinos	
3.3 <i>Tannerella forsythia</i>	
3.4 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	
4. Metodología microbiológica para el estudio de la microbiota subgingival patógena	
4.1 Toma de muestras microbiológicas	
4.2 Procesamiento de muestras microbiológicas: cultivo	
4.3 Procesamiento de muestras microbiológicas: técnicas moleculares	
IV. Justificación	25
V. Hipótesis	26
VI. Objetivos	27
VII. Material y métodos. Resultados	29

**Artículo 1:** Pérez-Salcedo L., Herrera D., Esteban-Saltiveri D., León R., Jeusette I., Torre C., O'Connor A., González I., Sanz M. (2011) Comparison of two sampling methods for microbiological evaluation of periodontal disease in cats. *Veterinary Microbiology* 149, 500-503.

**Artículo 2:** Pérez-Salcedo L., Herrera D., Esteban-Saltiveri D., León R., Jeusette I., Torre C., O'Connor A., González I., Sanz M. (2013) Isolation and identification of *Porphyromonas* spp. and other putative pathogens from cats with periodontal disease. *Journal of Veterinary Dentistry* 30 (4): 208-213.

**Artículo 3:** Pérez-Salcedo L., Laguna E., Sánchez M.C., Marín M.J., O'Connor A., González I., Sanz M., Herrera D. (2015) Molecular identification of black-



pigmented bacteria species from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease. *Journal of Small Animal Practice* 56 (4): 270-275

VIII. Discusión	41
– Comparación de dos métodos de toma de muestras microbiológicas para evaluar las enfermedades periodontales en gatos (Estudio 1)	
– Aislamiento e identificación de las especies de <i>Porphyromonas</i> y otros patógenos putativos asociados a gatos con enfermedades periodontales (Estudio 2)	
– Identificación molecular de bacterias negro-pigmentadas de muestras subgingivales en gatos que padecen enfermedades periodontales (Estudio 3)	
– Implicaciones de los nuevos conocimientos sobre la microbiota subgingival asociada a enfermedades periodontales en gatos	
IX. Conclusiones	51
X. Referencias	53
XI. Anexo: Resumen en Inglés	61

## **PREFACIO**

La presente tesis doctoral está basada en los tres artículos siguientes:

Artículo 1: Pérez-Salcedo L., Herrera D., Esteban-Saltiveri D., León R., Jeusette I., Torre C., O'Connor A., González I., Sanz M. (2011) Comparison of two sampling methods for microbiological evaluation of periodontal disease in cats. *Veterinary Microbiology* 149, 500-503.

Artículo 2: Pérez-Salcedo L., Herrera D., Esteban-Saltiveri D., León R., Jeusette I., Torre C., O'Connor A., González I., Sanz M. (2013) Isolation and identification of *Porphyromonas* spp. and other putative pathogens from cats with periodontal disease. *Journal of Veterinary Dentistry* 30 (4): 208-213.

Artículo 3: Pérez-Salcedo L., Laguna E., Sánchez M.C., Marín M.J., O'Connor A., González I., Sanz M., Herrera D. (2015) Molecular identification of black-pigmented bacteria species from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease. *Journal of Small Animal Practice* 56 (4): 270-275



## RESUMEN

**Antecedentes:** Las enfermedades periodontales en gatos son muy prevalentes, se estima que el 70% de los gatos de edades comprendidas entre 20 y 27 meses, y en el 85% en gatos mayores de 6 años, están afectados. Los signos y síntomas de estas enfermedades incluyen inflamación gingival, sangrado, presencia de placa, cálculo, halitosis, recesiones gingivales, bolsas periodontales y movilidad dentaria. Su etiología es infecciosa y se asocia a la microbiota subgingival. Las especies de *Porphyromonas* son el género más estudiado.

**Objetivo:** El objetivo principal de este grupo de investigaciones fue estudiar la microbiota subgingival de gatos y su asociación con las enfermedades periodontales, validando las metodologías empleadas en estudios en humanos.

### **Material y Métodos. Resultados.**

En el **Estudio 1** se realizó un estudio piloto, donde el objetivo fue comparar dos técnicas de toma de muestras microbiológicas, para evaluar la microbiota asociada a las enfermedades periodontales en gatos. Se evaluaron 10 gatos, a los que se les realizó un examen clínico, bajo sedación. La toma de muestras microbiológicas fue supragingival, frotando con torunda de algodón sobre el margen gingival del canino superior derecho, y subgingival, con puntas de papel insertadas en la bolsa periodontal. Las muestras se procesaron mediante cultivo en placas de agar sangre, Dentaaid-1, y medio específico para *Bartonella henselae*. Los resultados mostraron que la estrategia subgingival, obtiene mayores recuentos de flora anaerobia con diferencias estadísticamente significativas, y mayor frecuencia de detección para *Porphyromonas gulae*, reduciendo el número de falsos negativos.

En el **Estudio 2** se evaluaron 40 gatos más, a los que se les realizó un examen clínico y se tomaron muestras microbiológicas con la estrategia subgingival, con el objetivo de evaluar la microbiota subgingival y determinar los patógenos periodontales, implicados en las enfermedades periodontales en gatos. Además de correlacionar los hallazgos microbiológicos con las variables clínicas. Los resultados mostraron tres especies bacterianas detectadas frecuentemente: *P. gulae* (86%), *Porphyromonas circumdentaria* (70%) y *Fusobacterium nucleatum* (90%). La proporción en la flora total fue alta para *P. gulae* (32.5%), moderada para *P. circumdentaria* (8.8%) y baja para *F. nucleatum*

(3.9%). Los gatos que presentaban más del 10% de *P. gulae*, mostraron mayor movilidad y recesión, con diferencias estadísticamente significativas, y una tendencia a mayor profundidad de sondaje y pérdida de inserción.

En el **Estudio 3**, se caracterizaron las bacterias negro-pigmentadas aisladas en las muestras subgingivales en gatos con enfermedades periodontales. Se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 65 muestras aisladas de 50 gatos. Los resultados mostraron ocho perfiles filogenéticos: *P. gulae* (40%), *P. gingivalis*/*P. gulae* (36.9%) *P. gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 406 (9.2%), *Odoribacter denticanis* (6.2%), *P. gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 348 (1.5%) y *P. circumdentaria* (1.5%). Al comparar estos resultados con los obtenidos en el estudio previo mediante cultivo, se observó una alta congruencia en la identificación de *P. gulae* (70%), mientras que en las colonias identificadas como *P. intermedia-similar* correspondían en un 80% a *P. gulae*.

**Conclusiones:** Los resultados de esta serie de estudios han confirmado la importancia etiológica de las especies bacterianas negro-pigmentadas, principalmente *Porphyromonas gulae*, en las enfermedades periodontales en gatos. Además, se comprobó que la toma muestras microbiológicas insertando puntas de papel de manera subgingival mejoró el recuento de bacterias periodonto-patógenas asociadas a la enfermedad periodontal en gatos, respecto a la técnica habitual con torunda de algodón; se observó una alta frecuencia de detección y elevadas proporciones de la flora anaerobia cultivada de *P. gulae*; y finalmente, las técnicas moleculares mostraron la presencia de *P. gulae* y de especies filogenéticamente muy cercanas, como *O. denticanis* y *P. circumdentaria*.

Palabras clave: Enfermedades periodontales, gatos, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas circumdentaria*, muestra microbiológica, cultivo, técnicas moleculares.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. ENFERMEDADES PERIODONTALES: CONCEPTO Y PREVALENCIA**

#### **1.1. Enfermedades periodontales en humanos**

Las enfermedades periodontales están entre las infecciones más prevalentes en humanos (Do y cols. 2013). Son un grupo de enfermedades de causa infecciosa, y de naturaleza inflamatoria que, en el caso de la periodontitis, cursa con la destrucción de los tejidos de soporte del diente, pérdida de inserción y de hueso alveolar, siendo la consecuencia final la pérdida dentaria (Lindhe y Nyman 1975). La periodontitis viene precedida de la gingivitis, y su progresión hacia la pérdida ósea y la pérdida de inserción está modulada por factores microbiológicos e inmunológicos (Socransky y cols. 1984). Por eso, se entiende la periodontitis como una enfermedad crónica causada por bacterias del biofilm subgingival, y que requiere un huésped susceptible para poner en marcha la reacción inflamatoria crónica que origina la destrucción periodontal (Kornman y cols. 1997). En estudios epidemiológicos se ha observado que la destrucción periodontal no es la consecuencia inevitable de la gingivitis, es decir, que la gingivitis no siempre progresará a periodontitis (Baelum y cols. 1988).

La prevalencia de la periodontitis se ha cifrado recientemente, con unos novedosos criterios de definición de caso, en un 47%, basándose en una muestra de 3742 adultos en Estados Unidos, con más del 80% de los casos con periodontitis moderada o avanzada (Eke y cols. 2012). España sería uno de los países europeos con mayor salud periodontal del continente, junto con Suiza y Suecia (Konig y cols. 2010). En Europa, se considera que alrededor del 30.5% de la población adulta presenta sondajes superiores a 4-5 mm, y hasta un 71.4% de la población de entre 65 y 74 años presenta pérdida de inserción mayores o iguales de 6 mm (Konig y cols. 2010). En la población española, se considera que más del 25% de los adultos jóvenes de 35 a 44 años presentan pérdida de inserción de 4-5 mm, y más del 5% mayores o iguales a 6 mm (Baca Garcia y cols. 1989; Bravo Pérez y cols. 2006; Llodra Calvo y cols. 2012). En la actualidad, la prevalencia de bolsas periodontales parece haber disminuido, siendo de un 25.4% en 2005 (Llodra Calvo y cols. 2012). Sin embargo, más de la mitad de la población española posee cálculo subgingival, más del 30% de los sujetos españoles tiene algún grado de patología periodontal y un 7% de los casos presentan movilidad

dentaria (Llodra Calvo y cols. 2012). En la población española, se han publicado cifras de edentulismo de hasta un 16.9%, con un número medio de tres dientes ausentes en pacientes menores de 44 años, y de hasta 14 en pacientes de 65 a 74 años (Konig y cols. 2010).

La periodontitis crónica incluye síntomas como alteraciones en el color, textura y volumen del margen gingival, sangrado al sondaje, profundidad de sondaje, pérdida de inserción, recesiones, pérdida de hueso de soporte, exposición de furcas, movilidad dentaria y pérdida dentaria. Es más prevalente en adultos, aunque también puede ocurrir en niños. Se inicia y se mantiene por la placa microbiana, pero los factores del huésped determinan la patogénesis y la tasa de progresión. La tasa de progresión en el mayor de los casos es de lenta a moderada, aunque pueden ocurrir picos de progresión rápida. La cantidad de destrucción del tejido periodontal tiene correlación con la higiene oral, niveles de placa, factores locales predisponentes, tabaco, estrés y factores de riesgo sistémicos (Flemmig 1999).

Se puede clasificar, según la extensión, en:

- Localizada: cuando las localizaciones afectadas son menos del 30%.
- Generalizada: cuando exceden el 30%.

La severidad se clasifica basándose en el grado de pérdida de inserción:

- Leve: 1-2 mm.
- Moderado: 3-4 mm.
- Avanzada: mayor o igual a 5 mm.

Cada vez cobra mayor importancia la repercusión de las enfermedades periodontales sobre ciertas enfermedades sistémicas (Page 1998). Numerosas investigaciones implican a las enfermedades periodontales como factor de riesgo para algunas condiciones sistémicas, como las enfermedades cardiovasculares, el parto prematuro, la descompensación de la diabetes, o las enfermedades pulmonares (Joshapura y cols. 1996; Grossi y cols. 1997; Offenbacher y cols. 1999; Beck y Offenbacher 2005; Hill 1998).

## **1.2. Enfermedades periodontales en felinos**

En gatos, las dos enfermedades bucodentales más comunes son las lesiones reabsortivas y las enfermedades periodontales, siendo la prevalencia de ésta última muy elevada: concretamente, afecta a un 70% de los gatos jóvenes (20 a 27 meses de edad) y un 85% cuando son mayores de 6 años (Lobprise y cols. 1999; Harvey y cols. 2005; Niemiec y cols. 2008). Lo mismo ocurre en perros, donde se estima que de un 53% a un 95% muestran algún grado de enfermedad periodontal a partir de los 5 años.

Son enfermedades inflamatorias, inducidas por placa, que afectan a los tejidos de soporte del diente y engloba tanto gingivitis como periodontitis. La gingivitis se desarrolla con la presencia de placa dental, es una condición reversible porque remite al eliminar la placa dental. Al contrario de la periodontitis, que es irreversible porque conlleva la destrucción de los tejidos de soporte. Por este motivo, se considera la periodontitis una condición debilitante.

Los signos y síntomas son inflamación y sangrado gingival, presencia de placa, cálculo, halitosis, recesiones gingivales, bolsas periodontales y movilidad dentaria (Niemiec y cols. 2008). Se caracteriza por tener un trascurso de evolución lento y, en algunos casos severos, impide a los animales comer y beber de manera óptima (Mallonee y cols. 1988), de tal forma que puede afectar a la salud general (Cave y cols. 2012). La periodontitis en animales puede ocasionar efectos adversos como la anorexia, pérdida de peso, dolor crónico, pérdida de dientes y bacteriemia, por lo tanto, la infección puede afectar a otras partes del cuerpo (Nieves y cols. 1997).

El tratamiento tiene como objetivo controlar la inflamación tisular, devolviendo a la encía a su condición de salud clínica y evitando la destrucción progresiva del periodonto (Perry y Tutt 2015). El tratamiento de las enfermedades periodontales incluye el desbridamiento mecánico, tanto supragingival como subgingival, teniendo en cuenta la dificultad de esta última, debido a la falta de visualización y a que la placa subgingival se encuentra en las irregularidades de las raíces. Normalmente, se recomienda usar tanto dispositivos automáticos, como ultrasonidos, y curetas manuales (Niemiec y cols. 2008). En algunos casos de infecciones agresivas o la presencia de bacterias anaerobias negro-pigmentadas, es necesaria la combinación con tratamiento antimicrobiano; de hecho, se considera las enfermedades periodontales en gatos y perros, como una de las



patologías que más frecuentemente requieren tratamiento antibiótico (Khazandi y cols. 2014).

Los cuidados en casa son muy importantes en el tratamiento periodontal tanto en animales de compañía como en humanos. En animales de compañía existen dos tipos de cuidados dentales en casa: activos y pasivos. Los dos tipos son efectivos siempre que se realicen de manera adecuada, aunque los cuidados activos se consideran el tratamiento de referencia. Los cuidados activos consisten en cepillar los dientes de los animales de compañía: se debe realizar con un cepillo blando infantil y pasta dentífrica veterinaria, ya que las pastas humanas pueden causar daños gástricos. La frecuencia ideal es una vez al día, cuando los animales tienen problemas periodontales, aunque se considera más realista el cepillado 3 veces a la semana. Otra opción de cuidados activos son enjuagues con clorhexidina. Los cuidados dentales pasivos se basan en dietas específicas basadas en masticar. Estos métodos no requieren trabajo para el dueño de manera que el cumplimiento es más sencillo (Niemić y cols. 2008).

## **2. LA PLACA BACTERIANA COMO BIOFILM**

En humanos, es conocida la naturaleza infecciosa de las enfermedades periodontales y la etiología causada por bacterias específicas del biofilm subgingival.

El concepto clásico de placa bacteriana se ha redefinido con el concepto de biofilm, en el cual las bacterias presentes no se encuentran de manera aleatoria, sino que habitan de manera estructurada y organizada con una arquitectura consecuente con las necesidades de la microbiota. Se define como el conjunto de comunidades bacterianas íntimamente asociadas que se adhieren tanto a superficies naturales como artificiales. Generalmente se asocian a ambientes acuosos con una concentración de nutrientes necesaria para mantener las necesidades metabólicas de la comunidad bacteriana (Costerton y cols. 1995).

En la última década, el conocimiento acerca del biofilm ha cambiado radicalmente gracias al desarrollo de nuevas tecnologías aplicables a este campo. Estas técnicas comprenden la aplicación no invasiva del microscopio (por ejemplo, microscopía de láser confocal), la publicación de genomas microbianos y desarrollo de herramientas

moleculares. Estas técnicas han demostrado que los biofilms son comunidades altamente estructuradas, con canales que atraviesan la estructura para permitir el intercambio de nutrientes entre bacterias mediante sistemas circulatorios (Costerton y cols. 1995). Las especies componentes no se distribuyen de manera aleatorizada, sino que se disponen espacial y funcionalmente de forma organizada, con una elevada biodiversidad bacteriana.

La expresión génica varía respecto a la forma plantónica cuando las células forman parte del biofilm, resultando en un comportamiento fenotípico completamente diferente. Se ha propuesto que la heterogeneidad ambiental desarrollada en los biofilms puede acelerar la diversidad fenotípica y genotípica en las poblaciones bacterianas, constituyendo mecanismo que protege a las células de propiedades ambientales adversas (Boles y cols. 2004).

### **3. PATÓGENOS PERIODONTALES EN FELINOS Y HUMANOS**

#### **3.1. Especies bacterianas negro-pigmentadas en humanos**

Entre el grupo de especies bacterianas asociadas a la etiología de la periodontitis en humanos, el papel de las especies denominadas como negro-pigmentadas ha sido ampliamente estudiado, y la importancia de *Porphyromonas gingivalis* como indicador de riesgo del inicio y progresión de la periodontitis en humanos está bien establecido. La prevalencia de *P. gingivalis* en sujetos sanos periodontalmente varía entre un 10% y un 25%, mientras que en sujetos que padecen periodontitis varía de un 59% a un 79% (van Winkelhoff y cols. 2002).

Las bacterias negro-pigmentadas se han asociado generalmente a infecciones mixtas y fueron clasificadas en varios grupos según Burdon (1928) y Macdonald y cols. (1960). En los años 1970 se reclasificaron según su actividad sacarolítica: asacarolíticas (*P. gingivalis*), nivel intermedio de fermentación de carbohidratos (*Prevotella intermedia*) y actividad altamente sacarolítica (*Prevotella melaninogenica*).

Según el *World Workshop in Periodontology* (Consensus Report 1996), *P. gingivalis* se considera como uno de los patógenos periodontales con asociación fuerte a enfermedad,

en base a los criterios de Socransky, junto con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia*.

*P. gingivalis* es una bacteria Gram-negativa, anaerobia, no móvil. Forma colonias de color café, con zonas de hemólisis en las placas de agar sangre. Posee hemaglutininas que participan del proceso de hemaglutinación de las células rojas sanguíneas, con la capacidad de unión a los eritrocitos y adherencia a células epiteliales. Tiene crecimiento lento y es necesario incubarla al menos durante 7 días. Forma colonias redondas, convexas, uniformes y de márgenes bien definidos, de coloración verdosas, pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular. Puede tardar 2 semanas en adquirir la pigmentación oscura y poseen un diámetro de 1-2 mm (Sanz y cols. 2004).

Se conoce como un patógeno clave en la periodontitis crónica debido a sus factores de virulencia y de colonización (van Winkelhoff y cols. 1988). Se ha observado que induce un elevado número de respuestas inmunológicas tanto a nivel local como sistémico en sujetos con varias formas de periodontitis (Haffajee y Socransky 1994). Dentro de los factores de virulencia más importantes de *P. gingivalis* se encuentra la capacidad de la bacteria de invadir las células epiteliales humanas (Rudney y cols. 2001) y esto se ha asociado a la presencia de fimbrias.

Dentro del grupo de las especies negro-pigmentadas, *Prevotella intermedia* es la segunda en recibir un interés considerable. Es Gram-negativa, anaerobia y se ha observado que su presencia es elevada en gingivitis necrosante (Loesche y cols. 1982), en algunas formas de periodontitis (Herrera y cols. 2000) y en localizaciones con destrucción periodontal en periodontitis crónica (Tanner y cols. 1996; Lopez 2000). Forma colonias redondas, convexas y de color negro.

La presencia de *P. gingivalis* en solitario (Grossi y cols. 1994) o en combinación con *P. intermedia* (Beck y cols. 1990, 1992; Feng y cols. 2014) se ha identificado como indicador de riesgo de periodontitis. De la misma manera, ambos patógenos juegan un papel importante como factores pronóstico de destrucción periodontal futura (Machtei y cols. 1997; Cugini y cols. 2013). Por el contrario, en condiciones de salud oral, se encuentran en bajas proporciones.

### 3.2. Especies bacterianas negro-pigmentadas en felinos

En las enfermedades periodontales en gatos, la literatura es relativamente escasa, aunque la mayor parte de los estudios remarcan la importancia en la etiología de las enfermedades periodontales de las especies bacterianas negro-pigmentadas.

Las bacterias en la placa dental se encuentran organizadas en biofilm microbianos compuestos por comunidades complejas de micro-organismos. Se han identificado en estos biofilms alrededor de 500 especies en la boca de perros y gatos, sanos y enfermos (Harvey y cols. 1995). En condiciones de salud periodontal, las bacterias asociadas al biofilm son en su mayoría cocos y bacilos Gram positivos, incluyendo *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., y otros anaerobios facultativos (Harvey y cols. 1995). Por el contrario, en condiciones de enfermedades periodontales, las bacterias Gram-negativas anaerobias estrictas forman de manera mayoritaria el biofilm subgingival, siendo los géneros más prevalentes *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Fusobacterium* (Norris y Love 1999, 2000, 2001; Fournier y cols. 2001). Además, las unidades formadoras de colonias de anaerobios tanto facultativos como estrictos se consideran un predictor de la enfermedad periodontal en gatos (Norris y Love 1999).

Dentro de las bacterias anaerobias facultativas y estrictas, el género bacteriano más estudiado son *Porphyromonas* spp. (Norris y Love 1999, 2000; Love y cols. 2002). La presencia de *Porphyromonas* spp. y el aumento de su prevalencia se ha asociado con la enfermedad periodontal y su severidad (Mallonee y cols. 1988; Harvey y cols. 1995; Harvey y cols. 2005; Perez-Salcedo y cols. 2013; Khazandi y cols. 2014). Norris y Love, en 1999, realizaron un estudio donde se calculó el coeficiente de correlación entre las unidades formadoras de colonias de las especies de *Porphyromonas* y el grado de enfermedad periodontal, y se obtuvo un resultado estadísticamente significativo de  $R=0.5$ .

*Porphyromonas gulae* es una especie relativamente nueva (Fournier y cols. 2001), aislada en el surco gingival de varios animales, siendo una cepa diferente a *P. gingivalis* en humanos. Este microorganismo es Gram-negativo, no mótil, no forma esporas, y es un bacilo que crece preferentemente en forma de colonias negropigmentadas en un ambiente anaerobio estricto con metabolismo asacarolítico.

Además de *P. gulae*, se han estudiado en gatos otras dos especies de *Porphyromonas*, *Porphyromonas circumdentaria* y *Porphyromonas salivosa*. Se ha evaluado la correlación entre las unidades formadoras de colonias de cada una de estas especies y el grado de enfermedad periodontal, siendo  $R=0.5$  para *P. gulae* (como se ha visto antes), 0.2 para *P. salivosa* y 0.1 para *P. circumdentaria*, de tal forma que se considera a las tres especies como predictores de la enfermedad periodontal en gatos (Norris y Love 1999, 2000).

La importancia de las bacterias negro-pigmentadas en la etiología de las enfermedades periodontales en humanos se debe a los factores de virulencia. Existe mucha literatura acerca de las fimbrias de varias cepas de *P. gingivalis*, debido a su importancia en la colonización y la invasión tisular. Por el contrario, existe muy poca información acerca de las fimbrias de las especies de *Porphyromonas* en gatos. Collins y Love (1992) describieron la presencia de abundantes fimbrias en la superficie de cepas felinas de *P. gingivalis*, *P. circumdentaria* y *P. salivosa*. Norris y Love (2001) realizaron el primer estudio que describe la respuesta de los anticuerpos en suero a las fimbrias aisladas de *P. salivosa*, y su asociación con el grado de enfermedad periodontal. Sugirieron que *P. salivosa* es un organismo importante, presente en la cavidad oral de gatos con diferentes grados de enfermedad periodontal, y que tiene un alto potencial inmune en la boca de gatos, siendo más alto cuanto más sea la severidad de enfermedad periodontal. A su vez, se observa como las fimbrias de *P. salivosa* mantienen similitud física con las descritas en *P. gingivalis* en humanos.

Otra bacteria negro-pigmentada asociada a las enfermedades periodontales en perros es *Odoribacter denticanis*, previamente llamada *Porphyromonas denticanis*, que es una bacteria negro-pigmentada, anaerobia, Gram-negativa, no mótil, fusiforme y catalasa positiva (Lobprise 2006; Hardham y cols. 2008).

De manera adicional, se ha sugerido que la presencia de *Porphyromonas* spp. se debe tener en cuenta en el tratamiento de las enfermedades periodontales en gatos domésticos (Norris y Love 1999). De manera similar, *O. denticanis*, *P. gulae* y *P. salivosa* se han identificado como patógenos significativos en la etiología de la periodontitis canina (Boyce y cols. 1995; Lobprise 2006).

### **3.3. *Tannerella forsythia***

*Tannerella forsythia* es un bacilo fusiforme, Gram-negativo, anaerobio estricto, no mótil. Junto con *P. gingivalis* y *Treponema denticola* forma el *cluster* rojo, que es el más asociado a patología periodontal en humanos (Socransky y cols. 1998). Requiere ácido N-acetilmurámico para que pueda crecer.

En humanos, se ha observado su presencia en periodontitis, lesiones de progresión activa y en abscesos periodontales (Herrera y cols. 2000; van Winkelhoff y cols. 2002; Lau y cols. 2004). En un estudio, se analizó la microbiota subgingival de 114 pacientes, con periodontitis crónica, de poblaciones de Chile, Colombia y España, y se calculó la frecuencia de distribución de 9 patógenos periodontales, incluyendo *T. forsythia*. En los resultados se observó que la población colombiana tenía la periodontitis más severa, con profundidades de sondaje significativamente mayores, y asociándose a un predominio de *T. forsythia* (36-39%), comparado con la población chilena (menor frecuencia de detección) (Herrera y cols. 2008). Se considera que la prevalencia de *Tannerella forsythia* en sujetos sanos periodontalmente es del 48% mientras que en pacientes periodontales es del 91% (van Winkelhoff y cols. 2002).

*T. forsythia* se ha aislado en mordeduras de gatos (Hudspeth y cols. 1999) y se ha asociado a la enfermedad periodontal en gatos. La prevalencia en gatos sanos es del 89% en las muestras analizadas mediante cultivo y del 98% en las muestras analizadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mientras que en gatos que padecen enfermedad periodontal se observó en el 100% de las muestras analizadas con ambos métodos (Booij-Vrieling y cols. 2010). A pesar de que la presencia de este patógeno es muy elevada tanto en gatos sanos como enfermos, la carga bacteriana medida de unidades formadoras de colonias era significativamente mayor en gatos que padecen enfermedad periodontal comparado con gatos sanos (Booij-Vrieling y cols. 2010).

### **3.4. *Fusobacterium nucleatum***

*Fusobacterium nucleatum* es un bacilo con forma de huso, no forma esporas, no es mótil, es anaerobio y Gram-negativo. No posee fimbrias, pili ni flagelos, pero cuenta con una cápsula mucopolisacárida, de grosor variable, que pudiera ser importante en su capacidad patogénica. Las colonias no tienen características típicas ni consistentes, por lo que no resulta útil para su identificación visual.

Este patógeno es altamente prevalente en sujetos con periodontitis (Socransky y Haffajee 2002) y en abscesos periodontales (Herrera y cols. 2000). Uno de los factores de virulencia más importantes de este microorganismo en la patogenia de la enfermedad periodontal es la co-agregación. Se trata de un fenómeno altamente específico, que no se establece entre cualquier especie. De acuerdo con la revisión de Kolenbrander y cols. (2002), la presencia de *F. nucleatum* precede a *T. denticola* y *P. gingivalis* en la sucesión bacteriana y, puede que sea necesaria para que éstas lleguen a unirse al biofilm.

En gatos, el estudio de *F. nucleatum* en la asociación con la enfermedad periodontal ha sido muy escaso. Se ha observado la presencia de este patógeno en abscesos subcutáneos en gatos, siendo *F. nucleatum* el patógeno anaerobio más frecuentemente detectado (Hoshuyama y cols. 1996). También se ha aislado en muestras subgingivales de perros que padecen enfermedad periodontal mientras que *Fusobacterium russi* se aisló en gatos (Khazandi y cols. 2014).

#### **4. METODOLOGÍA MICROBIOLÓGICA PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL PATÓGENA**

##### **4.1. Toma de muestras microbiológicas**

En el estudio de la microbiota asociada a las enfermedades periodontales, la técnica habitual de tomas de muestras microbiológicas en gatos es la torunda de algodón (Norris y Love 1999, 2000), mientras que en humanos se utilizan las puntas de papel y las curetas (Casas y cols. 2007). Incluso en investigaciones recientes se siguen usando torundas de algodón en gatos (Booij-Vrieling y cols. 2010), aunque la toma de muestras subgingivales con puntas de papel en gatos se haya propuesto en el pasado (Mallonee y cols. 1988). En otros estudios, el método usado para tomar las muestras microbiológicas no está explicado (Allaker 2002; Harvey y cols. 2005). Por lo tanto, no existe ningún estudio que compare la eficacia de diferentes métodos de toma de muestras para evaluar la microbiota subgingival en gatos.

#### **4.2. Procesamiento de las muestras microbiológicas: cultivo**

La técnica de cultivo en el procesamiento de muestras microbiológicas es el procedimiento de referencia. Sus dos mayores ventajas son la capacidad de identificar a microorganismos no buscados y la posibilidad de evaluar susceptibilidades a antimicrobianos. Sus defectos son los requerimientos de tiempo, dinero, conocimientos específicos, personal cualificado y la imposibilidad de cultivar más de la mitad de los microorganismos presentes en la microbiota bucal.

Las fases del cultivo son: toma de muestras, transporte, dispersión, dilución, incubación, medios de cultivo e identificación. La identificación se basa en diferentes criterios que se aplican de manera sucesiva, hasta alcanzar una identificación de presunción:

- Morfología de la colonia
- Hallazgos al microscopio
- Tolerancia al oxígeno
- Caracterización bioquímica

Para alcanzar la identificación definitiva son necesarias técnicas de evaluación de la secuencia de ADN.

#### **4.3. Procesamiento de las muestras microbiológicas: técnicas moleculares**

Aunque la técnica de cultivo es la referencia de las técnicas de procesamiento de muestras microbiológicas, tiene algunas limitaciones en cuanto a la identificación de especies bacterianas (Perez-Salcedo y cols. 2015), y en varios estudios se han utilizado técnicas moleculares para estudiar estas especies en diferentes muestras biológicas (Grimont y Grimont 1986; Rudney y Larson 1994; Mota y cols. 2006; Riggio y cols. 2008).

Los estudios con técnicas moleculares permiten discernir especies relevantes diferentes entre especies bacterianas semejantes. Aunque *P. gulae* es semejante a *P. gingivalis* del humano, difiere en la actividad frente a catalasa (Laliberte y Mayrand 1983) y a la especificidad antigénica (Parent y cols. 1986), de manera que se sugiere la existencia de dos biotipos. Los análisis realizados sobre la secuencia del gen 16S rARN y los datos de



hibridación ADN-ADN demuestran que *Porphyromonas* de origen humano (*P. gingivalis*) es diferente de *Porphyromonas* de origen animal (*P. gulae*, *P. circumdentaria*, *Odoribacter denticanis*, *Porphyromonas gingivicanis*) (Fournier y cols. 2001; Conrads y cols. 2005). En un estudio de 2008, se determinaron las relaciones filogenéticas de una muestra de *Porphyromonas* catalasa positiva, previamente caracterizada como *P.gingivalis-similar* aisladas en animales marsupiales, y compararon los resultados con *P. gulae* y *P. gingivalis*, así como con otras especies de *Porphyromonas*. Los resultados del análisis filogenético identificaron tres grupos distintos de cepas. El grupo 1 contenía *P. gingivalis* de origen humano. El grupo 2 contenía *P. gulae* de origen de animales tanto marsupiales como no marsupiales. Y el grupo 3 contenía cepas de animales marsupiales distintas de *P. gulae*, de manera que se puede intuir que constituye una nueva especie de *Porphyromonas* (Mikkelsen y cols. 2008). Esta distinción ha sido posible gracias a técnicas de biología molecular. Hoy en día estas técnicas moleculares son capaces de proporcionar una identificación más exacta y segura de los microorganismos analizados (Schlegel y cols. 2003).

De entre las diferentes técnicas de biología molecular, realizadas tras la extracción adecuada de ADN, tanto la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*) y el análisis del fragmento de restricción de ADN ribosomal amplificado denominado ARDRA por sus siglas en inglés (*amplified ribosomal rADN restriction analysis*), son métodos generales de identificación y tipificación (Grimont y Grimont 1986), además de ser técnicas rápidas y eficientes.

Debido a la relevancia de las enfermedades periodontales en la salud y bienestar de los gatos y la importancia etiológica de estos patógenos, tanto en términos de su presencia relativa en la microbiota subgingival o como reservorio de periodonto-patógenos y posible vector de transmisión para infecciones orales humanas, el estudio de estas bacterias en gatos es muy relevante.

## JUSTIFICACIÓN

En gatos, las enfermedades periodontales tienen una alta prevalencia, e incluyen tanto la gingivitis y la periodontitis: la primera es reversible al eliminar la placa dental, mientras que la periodontitis es irreversible, ya que conlleva la destrucción del periodonto y tiene como última consecuencia la pérdida dentaria (Lobprise y cols. 1999; Harvey y cols. 2005; Niemiec y cols. 2008). La periodontitis es una enfermedad inflamatoria de causa bacteriana, que se considera una condición debilitante al producirse pérdida de los tejidos periodontales, por lo tanto afecta a las condiciones de salud general del gato, ya que dificulta su alimentación (Mallonee y cols. 1988; Cave y cols. 2012).

La importancia de las especies bacterianas negro-pigmentadas en la etiología de las enfermedades periodontales en gatos es conocida, aunque la literatura es relativamente escasa. Dentro de este grupo el género más estudiado es *Porphyromonas* spp. estando su presencia asociada a la severidad de la enfermedad (Mallonee y cols. 1988; Norris y Love 1999, 2000, 2001; Mikkelsen y cols. 2008; Booij-Vrieling y cols. 2010). Dentro del género, tanto *P. gulae*, *P. circumdentaria* como *P. salivosa* son especies bacterianas asociadas con las enfermedades periodontales y su severidad en gatos (Norris y Love 1999, 2000).

El estudio de las diferentes especies bacterianas presentes en la boca asociadas a enfermedades periodontales en gatos es importante, no sólo para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la misma, sino que la presencia de bacterias en animales de compañía es un reservorio de periodonto-patógenos (Booij-Vrieling y cols. 2010) y posible vector de transmisión para infecciones orales humanas.

Existe poca literatura que estudie la microbiota subgingival en gatos con enfermedades periodontales, y la mayoría de los estudios han usado la torunda de algodón sobre el margen gingival como método de toma de muestras microbiológicas, mientras que en humanos la técnica habitual de toma de muestras es con puntas de papel, de manera subgingival. Del mismo modo, se considera relevante el uso de técnicas moleculares como ayuda en la identificación de los posibles patógenos.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis general**

El estudio de la microbiota subgingival en gatos con enfermedades periodontales, con la metodología de toma de muestras, de procesado y de identificación adecuados (basadas en los estudios en humanos), confirma el papel patogénico de *Porphyromonas gulae*, entre otras especies bacterianas negro-pigmentadas.

### **Hipótesis específicas**

- Las muestras microbiológicas tomadas con puntas de papel, comparadas con la toma de muestras mediante torunda de algodón, obtendrán recuentos bacterianos más fiables y una descripción más exacta en cuanto a la carga bacteriana y su composición, en el estudio de la microbiota subgingival en gatos con enfermedades periodontales (Estudio 1).
  
- Existe una asociación entre la presencia de patógenos putativos (incluyendo *Porphyromonas* spp.) subgingivales en gatos y las variables clínicas asociadas con las enfermedades periodontales (Estudio 2).
  
- Las técnicas moleculares permiten la identificación adecuada de especies bacterianas negro-pigmentadas, presentes en la placa subgingival de gatos que padecen enfermedades periodontales, siendo los resultados más fiables que los obtenidos con la técnica de cultivo microbiológico (Estudio 3).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Estudiar la microbiota subgingival de gatos y su asociación con las enfermedades periodontales, validando las metodologías empleadas en estudios en humanos.

### **Objetivos específicos**

- Comparar dos métodos de toma de muestras para estudiar la microbiota subgingival asociada a la enfermedad periodontal en gatos (Estudio 1).
  
- Evaluar la presencia y proporciones de los patógenos implicados en la enfermedad periodontal en gatos y correlacionar los resultados con las variables clínicas (Estudio 2).
  
- Caracterizar, mediante técnicas moleculares, las especies bacterianas negro-pigmentadas aisladas, procedentes del surco gingival de gatos con enfermedad periodontal (Estudio 3).



## **ESTUDIO 1**



**Estudio 1: Pérez-Salcedo L., Herrera D., Esteban-Saltiveri D., León R., Jeusette I., Torre C., O'Connor A., González I., Sanz M. (2011) Comparison of two sampling methods for microbiological evaluation of periodontal disease in cats. *Veterinary Microbiology* 149, 500-503.**

### **Comparación de dos métodos de toma de muestras microbiológicas para evaluar las enfermedades periodontales en gatos.**

**Antecedentes.** Las enfermedades periodontales en gatos son muy prevalentes, y su etiología se asocia a las bacterias localizadas en la microbiota subgingival, siendo las especies de *Porphyromonas* el género más relevante. La técnica convencional de toma de muestras microbiológicas en gatos, es con torunda de algodón sobre el margen gingival, sin embargo en humanos la técnica usada es con puntas de papel en la bolsa periodontal.

**Objetivos.** El objetivo fue comparar dos estrategias de toma de muestras, subgingival con puntas de papel y supragingival con torunda de algodón, para la evaluación de la microbiota asociada a las enfermedades periodontales en gatos.

**Material y Métodos.** Se diseñó un estudio piloto, en el que se evaluó clínica y microbiológicamente a 10 gatos. Se utilizaron dos estrategias microbiológicas: (1) Subgingival: se seleccionaron 4 localizaciones, una por cuadrante, basándose en profundidad de sondaje, sangrado y fácil acceso; se introdujeron 2 puntas de papel consecutivas en la bolsa periodontal, y se mantuvieron durante 10 segundos; todas las puntas se introdujeron en un vial de fluido de transporte reducido (RTF), y se enviaron al laboratorio en un periodo de 24 horas. (2) Supragingival: tras eliminar el exceso de saliva, con una torunda de algodón estéril humedecida en RTF se frotó sobre el margen gingival y el esmalte adyacente de canino superior derecho, alrededor de 20 veces; la torunda se separó en un vial con RTF y se envió al laboratorio en un periodo de 24 horas. Las muestras se cultivaron en agar sangre, tanto con incubación aerobia como anaerobia, en Dentaaid-1 para identificar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y entéricos y en un medio específico para *Bartonella henselae*.

**Resultados.** Los resultados mostraron mayores recuentos de anaerobios para las puntas de papel ( $6.5 \pm 0.5$ ) con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.03$ ) al compararlas con torunda de algodón ( $5.5 \pm 1.1$ ). Además, el uso de puntas de papel aumentó la frecuencia de detección de la mayoría de los patógenos, reduciendo el



número de falsos positivos para *Porphyromonas gulae* (100% con puntas de papel y 80% con torunda de algodón). Se observaron los mismos resultados para *Fusobacterium nucleatum*, mientras que para *Porphyromonas circumdentaria* solo una muestra fue negativa.

**Conclusiones.** Los recuentos bacterianos fueron significativamente mayores para las bacterias anaerobias y se observó una mayor frecuencia de detección de los patógenos periodontales putativos cuando la toma de muestras microbiológicas se realizó con puntas de papel, en gatos con enfermedades periodontales.



## Short communication

Comparison of two sampling methods for microbiological evaluation of periodontal disease in cats<sup>☆</sup>

L. Pérez-Salcedo<sup>a,\*</sup>, D. Herrera<sup>a</sup>, D. Esteban-Saltiveri<sup>b</sup>, R. León<sup>a</sup>, I. Jeusette<sup>c</sup>, C. Torre<sup>c</sup>, A. O'Connor<sup>a</sup>, I. González<sup>a</sup>, M. Sanz<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Research, Faculty of Odontology, University Complutense, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Tot Cat, Veterinary Clinic, C/ Aribau 103, 08036 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Affinity Petcare, Plaza Xavier Cugat, 2-Ed D, 08174 Sant Cugat del Vallés, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 April 2010

Received in revised form 19 October 2010

Accepted 16 November 2010

## Keywords:

Cats

*Porphyromonas gulae*

Microbiology

Microbiological samples

Periodontal disease

## ABSTRACT

**Background:** Periodontal disease in cats is highly prevalent, and its aetiology is associated to bacteria located in the subgingival microbiota, being *Porphyromonas* sp. the most prevalent genus. The conventional technique to sample the subgingival microbiota is the use of cotton swabs over the mucosa and teeth; however the use of subgingival paper points could improve the bacterial recovery.

**Aim:** The objective was to compare two microbial sampling approaches for the evaluation of the periodontal disease-associated microflora in cats.

**Methods:** The study was designed as a pilot study. Ten cats were clinically evaluated and sampled under sedation. Subgingival pooled samples were collected from four sites. In parallel, samples were obtained with a cotton swab, by striking over the gingival margin and surface of the upper right canine. Samples were cultured on blood agar (aerobic and anaerobic incubation), Dentaaid-1 (for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and enterics), and a specific medium for *Bartonella henselae*.

**Results:** For total anaerobic counts, paper point samples ( $6.59 \pm 0.5$ ) demonstrated significantly higher counts ( $p = 0.03$ ) than cotton swab samples ( $5.54 \pm 1.1$ ). Moreover, the use of paper points increased the frequency detection of most pathogens thus reducing false negatives for *Porphyromonas gulae* (100% with paper points samples and 80% with cotton swab samples).

**Conclusions:** Significant higher recoveries of anaerobic bacteria and more frequent detection of putative periodontal pathogens was observed when microbiological sampling was performed with paper points, in cats with periodontal disease.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Periodontal diseases are very common in cats. In the USA, it is estimated that 70% of cats aged between 20 and 27 months and 85% of cats older than 6 years old, are affected

(Harvey, 2005; Lobprise et al., 1999; Niemiec, 2008). The typical signs and symptoms of these conditions include gingival inflammation and bleeding, visible plaque accumulation, calculus, halitosis, gingival recession, periodontal pocket formation and mobile teeth (Niemiec, 2008).

The underlying aetiology of periodontal diseases is infectious, from the bacteria residing in dental plaque, which is a characteristic microbial biofilm composed of complex communities of micro-organisms. Around 500 bacterial species have been identified to date in these biofilms, both in healthy and diseased oral cavities from dogs and cats (Harvey et al., 1995).

<sup>☆</sup> Supported by Affinity-PetCare, Sant Cugat del Vallés, Spain.

\* Corresponding author. Tel.: +34 913941901.

E-mail addresses: [leireperezsalcedo@hotmail.com](mailto:leireperezsalcedo@hotmail.com) (L. Pérez-Salcedo), [davidher@odon.ucm.es](mailto:davidher@odon.ucm.es) (D. Herrera), [rubenleonb@gmail.com](mailto:rubenleonb@gmail.com) (R. León), [ijeusette@affinity-petcare.com](mailto:ijeusette@affinity-petcare.com) (I. Jeusette), [labmicro@odon.ucm.es](mailto:labmicro@odon.ucm.es) (I. González), [marianosanz@odon.ucm.es](mailto:marianosanz@odon.ucm.es) (M. Sanz).

## **ESTUDIO 2**



**Estudio 2: Pérez-Salcedo L., Herrera D., Esteban-Saltiveri D., León R., Jeusette I., Torre C., O'Connor A., González I., Sanz M. (2013) Isolation and identification of *Porphyromonas* spp. and other putative pathogens from cats with periodontal disease. *Journal of Veterinary Dentistry* 30 (4): 208-213.**

**Aislamiento e identificación de las especies de *Porphyromonas* y otros patógenos putativos asociados a gatos con enfermedades periodontales.**

**Antecedentes:** La etiología de la enfermedad periodontal en humanos y la importancia de las bacterias específicas es bien conocida. Dentro de este grupo de bacterias, el papel de las bacterias negro-pigmentadas ha sido ampliamente estudiado, y la importancia de *Porphyromonas gingivalis* como indicador de riesgo para el inicio y progresión de la periodontitis es conocido. Sin embargo, en gatos los estudios acerca de la etiología de las enfermedades periodontales son relativamente escasos.

**Objetivos:** El objetivo de este estudio fue evaluar la microbiota subgingival y determinar los periodonto-patógenos más prevalentes implicados en las enfermedades periodontales felinas, y a su vez correlacionar estos hallazgos con las variables clínicas evaluadas.

**Material y métodos:** La muestra consistió en 50 gatos, 40 gatos sumados a los 10 evaluados en el estudio previo, a los que se les realizó un examen clínico, bajo sedación. Se midió profundidad de sondaje, nivel de inserción, índice gingival, de placa, de cálculo, de grosor de placa, de grosor de cálculo y por último movilidad dentaria. Posteriormente, se tomaron muestras microbiológicas subgingivales, como se describe en el Estudio 1, que se procesaron mediante cultivo en agar sangre y Dentaaid-1. Los patógenos sospechosos se identificaron, subcultivaron y se preservaron. Las asociaciones entre las variables clínicas y los hallazgos microbiológicos se realizaron mediante coeficientes de correlación (CC). Además, los gatos se estratificaron en subgrupos en relación a la presencia de los patógenos putativos.

**Resultados:** Se detectaron tres especies bacterianas con alta frecuencia: *Porphyromonas gulae* (86%), *Porphyromonas circumdentaria* (70%) y *Fusobacterium nucleatum* (90%). La proporción media en la flora total fue alta para *P. gulae* (32.5%), moderada para *P. circumdentaria* (8.8%) y baja para *F. nucleatum* (3.9%) . Entre las variables clínicas; la movilidad dentaria se correlacionó (CC>0.5, p<0.001) con recesión, profundidad de sondaje, nivel de inserción, índice gingival e índice de cálculo

(CC=0.29,  $p<0.04$ ), así como con los recuentos bacterianos totales (CC=0.38,  $P<0.006$ ). Los gatos con más del 10% de *P. gulae* mostraron más movilidad dentaria ( $p=0.014$ ) y recesión ( $p=0.038$ ), con diferencias estadísticamente significativas, y una tendencia a mayor profundidad de bolsa ( $p=0.084$ ) y pérdida de inserción ( $p=0.087$ ).

**Conclusiones:** Los resultados de este estudio transversal confirman que *P. gulae* es el patógeno más relevante en las enfermedades periodontales en gatos.

# Isolation and Identification of *Porphyromonas* spp. and Other Putative Pathogens from Cats with Periodontal Disease

L. Pérez-Salcedo, DDS; D. Herrera, DDS, PhD; D. Esteban-Saltiveri, DVM; R. León, BSD, PHD; I. Jeusette, DVM; C. Torre, DVM; A. O'Connor, BSD; I. González, DP; M. Sanz, DDS, PhD

## Summary:

The purpose of this study was to evaluate the subgingival microbiota and determine the most prevalent periodontal pathogens implicated in feline periodontal disease and to correlate these findings with the clinical periodontal status. Subgingival microbiological samples were taken under sedation from 50 cats with clinical signs of periodontal disease. Pooled paper point samples from 4 selected subgingival sites were cultured on blood agar and on Dentaid-1 medium. Suspected pathogens were identified, subcultured, and preserved. The association between the microbiological findings and the clinical status was studied using correlation coefficients (CC). In addition, cats were stratified in subgroups according to presence of putative pathogens, and comparisons were carried out using unpaired t-test. Three bacterial species were frequently detected including *Porphyromonas gulae* (86 %), *Porphyromonas circumdentaria* (70 %) and *Fusobacterium nucleatum* (90 %). The mean proportion of total flora was high for *P. gulae* (32.54 %), moderate for *P. circumdentaria* (8.82 %), and low for *F. nucleatum* (3.96 %). Among the clinical variables, tooth mobility was correlated ( $CC > 0.50$ ,  $p < 0.001$ ) with recession, pocket depth, attachment level, gingival index, and calculus index ( $CC = 0.29$ ,  $p = 0.04$ ) as well as with total bacterial counts ( $CC = 0.38$ ,  $p = 0.006$ ). Cats with more than 10 % of *P. gulae* showed significantly more mobility ( $p = 0.014$ ) and recession ( $p = 0.038$ ), and a tendency for deeper probing pocket depths ( $p = 0.084$ ) and attachment loss ( $p = 0.087$ ). The results from this cross-sectional study confirmed that *P. gulae* is the most relevant pathogen in periodontal disease in cats.

*J Vet Dent* 30 (4); 208-213, 2013

## Introduction

Periodontal disease is a very common condition in cats and its prevalence has been reported as affecting up to 70 % of cats between 20 and 27-months-old and up to 85 % of cats older than 6-years.<sup>1-4</sup>

In humans, there is no doubt concerning the infectious nature of periodontal diseases and the etiological importance of the colonization by specific bacteria of the subgingival biofilm.<sup>5,6</sup> Among these putative pathogens, the role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections has been widely studied and the importance of *Porphyromonas gingivalis* as a significant risk indicator for the initiation and progression of periodontitis in humans has been well established.<sup>7,8</sup> In feline periodontal disease, the most studied genera are *Porphyromonas* spp.<sup>9-14</sup> The presence of *Porphyromonas* spp. and their increased prevalence have been

associated with periodontal disease and its severity.<sup>15</sup> It has been suggested that the presence of *Porphyromonas* spp. in felids must be considered when treating periodontal diseases in domestic cats.<sup>11</sup>

*Porphyromonas gulae* is a relatively new species isolated from the gingival sulcus of various animal hosts, being different from the related strains of *P. gingivalis* in humans. This microorganism is a Gram-negative, non-motile and non-spore forming, rod shaped bacterium that preferentially grows as black pigmented colonies in an obligate anaerobic environment with an asaccharolytic metabolism.<sup>16</sup> In addition to *P. gulae*, two other *Porphyromonas* spp. have been studied in cats (*Porphyromonas circumdentaria*, *Porphyromonas salivosa*), both also being associated with periodontal disease.<sup>1,12</sup>

The hypothesis of the present cross-sectional clinical investigation was the existence of an association between the presence of putative pathogens (including *Porphyromonas* spp.) in the cat's subgingival environment, with clinical variables associated with periodontal disease. Therefore, the objective was to evaluate the presence and proportions of periodontal pathogens implicated in feline periodontal disease and to correlate these findings with periodontal clinical status.

## Materials and Methods

**Feline population:** Cats with visual clinical signs of inflammation were consecutively selected among cats scheduled for a veterinary procedure that required sedation, in a private clinical setting. Physical examination was performed before any procedure to assess risks related to sedation. Owners were informed of the objectives of the additional oral procedure and signed an informed consent, approved by an animal ethics committee. All cats were systemically healthy except 4 cats with chronic renal insufficiency, 1 cat positive for feline leukemia virus (FeLV), and 1 cat had lymphoma. Cats were sedated with dexmedetomidine<sup>a</sup> (0.025 mg/kg) and butorphanol<sup>b</sup> (0.25 mg/kg) IM; induction with ketamine<sup>c</sup> (5.0 mg) IM or IV; and, maintenance after intubation with oxygen and 2 % isoflurane<sup>d</sup>. The cats selected were 22 females and 28 males with a mean age of 9.0-years (SD 3.99; range 1-20).

**Clinical evaluation:** A periodontal clinical examination was performed, with registration of the following clinical variables at 6 sites per tooth (except tooth mobility) for 3 teeth in each quadrant: canine, third, and fourth premolar teeth. Data from all sites within a cat were averaged to calculate the overall index or value for each cat.

**Gingival index (GI)<sup>17</sup>:** 0 = absence of inflammation; 1 = mild inflammation without bleeding on probing; 2 = mild inflammation with bleeding on probing; 3 = moderate

### **ESTUDIO 3**





# Molecular identification of black-pigmented bacteria from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease

L. PÉREZ-SALCEDO\*, E. LAGUNA\*, M. C. SÁNCHEZ\*, M. J. MARÍN\*, A. O'CONNOR\*, I. GONZÁLEZ\*, M. SANZ† AND D. HERRERA†

\*Research Laboratory, Faculty of Odontology, University Complutense, Plaza de Ramón y Cajal, 28040 Madrid, Spain

†ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, Faculty of Odontology, University Complutense, Plaza de Ramón y Cajal, 28040 Madrid, Spain

**OBJECTIVES:** To characterise the black-pigmented bacterial species found in the subgingival samples of cats with periodontal disease using molecular-based microbiological techniques.

**METHODS:** Sixty-five subgingival samples obtained from 50 cats with periodontal disease were analysed by polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA restriction analysis and cloning and sequencing of the 16S rRNA genes.

**RESULTS:** Among the 65 subgingival samples, eight phylogenetic profiles were obtained, of which the most prevalent species were: *Porphyromonas gulae* (40%), *P. gingivalis*/*P. gulae* (36.9%), *P. gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 406 (9.2%), *Odoribacter denticanis* (6.2%), *P. gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 348 (1.5%) and *P. circumdentaria* (1.5%). When compared with the species resulting from biochemical diagnosis, the identification of *P. gulae* was congruent in 70% of the cases, while colonies identified as *P. intermedia*-like corresponded in 80% of cases to *P. gulae*.

**CLINICAL SIGNIFICANCE:** The use of molecular-based microbiological diagnostic techniques resulted in a predominance of *Porphyromonas* spp. in the subgingival plaque of cats suffering from periodontal disease. Further characterisation of these bacteria identified *P. gulae*, *O. denticanis* and *P. circumdentaria*. The more frequently detected phylogenetic profiles corresponded to *P. gingivalis* and *P. gulae*.

*Journal of Small Animal Practice* (2015) **56**, 270–275  
DOI: 10.1111/jsap.12319

Accepted: 12 November 2014

## INTRODUCTION

Periodontal disease is the most prevalent infection in humans (Do *et al.* 2013). Similarly, it is highly prevalent in cats, affecting 70% of young animals (20 to 27 months of age) and 85% when older than 6 years (Lobprise *et al.* 1999, Harvey 2005, Niemiec 2008). This condition usually progresses slowly and occasionally makes the animals reluctant to eat or drink properly (Mallonee *et al.* 1988), thus having the potential for impacting general health and wellbeing (Cave *et al.* 2012).

In humans, the aetiological importance of specific pathogens in the initiation and progression of periodontal disease has been

well established. Among these bacteria, *Porphyromonas gingivalis*, because of its colonisation and virulence characteristics, is a key pathogen in chronic periodontitis (van Winkelhoff *et al.* 1988). In fact, the presence of these bacterial species, either alone (Grossi *et al.* 1994) or in combination with *Prevotella intermedia* (Beck *et al.* 1990, 1992, Feng *et al.* 2013) has been identified as a risk indicator of periodontitis. Similarly both bacterial species play a significant role as prognostic factors for future periodontal breakdown (Machtei *et al.* 1997, Cugini *et al.* 2013). In healthy oral conditions, these bacteria are usually found in low levels.

*P. gingivalis* is a black-pigmented bacterial species, forming black-pigmented colonies after several days of incubation in

**Estudio 3: Pérez-Salcedo L., Laguna E., Sánchez M.C., Marín M.J., O'Connor A., González I., Sanz M., Herrera D. (2015) Molecular identification of black-pigmented bacteria from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease. *Journal of Small Animal Practice* 56 (4): 270-275**

### **Identificación molecular de bacterias negro-pigmentadas de muestras subgingivales en gatos que padecen enfermedades periodontales**

**Antecedentes:** En gatos, la literatura acerca de la etiología de las enfermedades periodontales es relativamente escasa, aunque la mayoría de los estudios remarcan la importancia de las bacterias negro-pigmentadas. Un gran número de los estudios procesan las muestras microbiológicas mediante cultivo, aunque las técnicas moleculares se han usado para estudiar estas especies, en diferentes muestras biológicas.

**Objetivos:** El objetivo fue caracterizar las especies bacterianas negro-pigmentadas, aisladas en muestras subgingivales, de gatos con enfermedades periodontales, usando técnicas moleculares.

**Material y métodos:** Se analizaron 65 muestras, de 50 gatos con enfermedades periodontales, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, amplificación del ADN ribosomal, análisis de restricción, clonación y secuenciación del gen 16S rARN.

**Resultados:** Se obtuvieron ocho perfiles filogenéticos de las 65 muestras, de los que las especies más prevalentes fueron: *Porphyromonas gulae* (40%), *Porphyromonas gingivalis*/*P. gulae* (36.9%), *P. gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 406 (9.2%), *Odoribacter denticanis* (6.2%), *P. gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 348 (1.5%) *Porphyromonas circumdentaria* (1.5%). *Tannerella forsythia*, fue el control positivo. Al comparar las especies identificadas mediante técnicas bioquímicas, se observó una alta congruencia (70%) en la identificación de *P. gulae*, mientras que las colonias identificadas como *P. intermedia-similar*, eran en un 80% *P. gulae*.

**Conclusiones:** Se puede concluir que el uso de técnicas moleculares, es capaz de identificar a las especies de *Porphyromonas* de manera predominante, en la placa subgingival de gatos que padecen enfermedades periodontales. La caracterización identifica a: *P. gulae*, *O. denticanis* y *P. circumdentaria*, siendo *P. gingivalis* y *P. gulae* el perfil filogenético más frecuentemente detectado.



## DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta investigación fue estudiar la microbiota subgingival en gatos y su asociación con las enfermedades periodontales, validando enfoques de estudio previamente usados en humanos. Para ello, se desarrollaron tres estudios de manera sucesiva.

El **Estudio 1** fue un estudio piloto, con 10 gatos con enfermedades periodontales, en el que se compararon dos métodos de toma de muestras microbiológicas (torunda de algodón o supragingival, y puntas de papel o subgingival). El método con torundas de algodón es el método usado normalmente en gatos, ya que es más fácil, se necesita menos tiempo y no requiere de sedación o anestesia (Norris y Love 1999, 2000, 2001; Booiy-Vrieling y cols. 2010) mientras que las puntas de papel es el método más usado en humanos, junto con las curetas (Casas y cols. 2007). Los resultados demostraron que la toma de muestras subgingival con puntas de papel, mejoraba el recuento de las especies bacterianas en gatos con enfermedad periodontal.

En el **Estudio 2**, se evaluaron 40 gatos más, sumando un total de 50 gatos con los 10 analizados en el estudio piloto, todos con puntas de papel, y se procesaron los resultados microbiológicos mediante cultivo, que se correlacionan con las variables clínicas evaluadas. Los resultados mostraron un alta frecuencia de detección de *P. gulae* (86%), *P. circumdentaria* (70%) y *F. nucleatum* (90%) en gatos con enfermedades periodontales. Se concluyó que las bacterias negro-pigmentadas tienen una especial relevancia en las enfermedades periodontales, especialmente *P. gulae* por su alta proporción en la microbiota total (32.5%).

En el **Estudio 3**, y debido a las limitaciones del procesamiento de las muestras con cultivo, se decidió caracterizar las bacterias negro-pigmentadas, aisladas en el estudio anterior, con PCR. Se analizaron un total de 65 cepas bacterianas, de los que se obtuvieron ocho perfiles filogenéticos: *P. gulae*, *P. gingivalis*/*P. gulae*, *P.gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 406, *Odoribacter denticanis*, *P.gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 348 y *P. circumdentaria*. Los resultados demostraron un alta concordancia

entre los resultados analizados con cultivo y con PCR en la identificación de *P. gulae*, mientras que para *P. intermedia-similar* los resultados eran altamente discordantes.

### **1. Comparación de dos métodos de toma de muestras microbiológicas para evaluar las enfermedades periodontales en gatos (Estudio 1)**

Los resultados demostraron que la toma de muestras subgingival con puntas de papel mejora el recuento de las especies bacterianas en gatos con enfermedades periodontales, respecto a la toma de muestra más habitual en estudios en gatos, con torunda de algodón. Se obtuvieron recuentos más altos de bacterias anaerobias, comparado con la técnica de torunda de algodón, con diferencias estadísticamente significativas (6.5 frente 5.5, en logaritmo de unidades formadoras de colonias). Además, en las muestras subgingivales se detectó la presencia de *P. gulae* en todas las muestras evaluadas, mientras que en las muestras tomadas con torundas de algodón sólo se encontró en 8 de 10. La misma tendencia se observó para *F. nucleatum* y para *P. circumdentaria*, aunque sólo una muestra tomada con torunda de algodón fue negativa. Además, la proporción de la flora total de *P. gulae* y *P. circumdentaria* fue mayor con la toma de muestras subgingivales, con diferencias estadísticamente significativas. Los resultados sugieren, además, la importancia etiológica de las especies de *Porphyromonas* en las enfermedades periodontales en gatos.

Los estudios previos, que han evaluado la microbiología de gatos con enfermedades periodontales, han utilizado en su mayoría la toma de muestras con torunda de algodón (Norris y Love 1999, 2000a, 2000b; Mikkelsen y cols. 2008; Booij-Vrieling y cols. 2010), ya que sugieren que así se limita la muestra al número de gatos que reciben anestesia general y a aquellos que padezcan periodontitis avanzada. Además, se afirma que al frotar la torunda de algodón sobre el margen gingival también se toma la muestra de la bolsa periodontal (Norris y Love 1999).

También existen estudios en los que la toma de muestra microbiológica es subgingival: Mallonee y cols. (1988), utilizaron una “azada” en el surco, Lobprise (2006) usó puntas de papel en la bolsa periodontal en perros, y Khazandi y cols. (2014) realizaron la toma de muestras subgingival con curetas estériles, tanto en gatos como en perros.

El Estudio 1 del presente trabajo es el primero en el que se compara la toma de muestras con torunda de algodón (supragingival) y la toma de muestras con puntas de papel (subgingival). Los resultados muestran que los hallazgos microbiológicos difieren tanto de manera cualitativa como cuantitativa al comparar los dos métodos. Es especialmente importante remarcar que las muestras microbiológicas tomadas con puntas de papel en la bolsa periodontal detectaron *P. gulae*, *P. circumdentaria* y *F. nucleatum* en todos los casos, mientras que esto no ocurrió con el abordaje con torunda de algodón. Se debe tener en cuenta que los gatos se evaluaron tanto clínicamente como microbiológicamente bajo sedación.

En la comparación entre métodos se deben tener en cuenta otros factores, ya que se puede considerar como limitaciones que la toma de muestras con puntas de papel es más compleja y requiere de más tiempo, y se debe sedar a los gatos (Booij-Vrieling y cols. 2010). Por lo tanto, la toma de muestras microbiológicas subgingival, con puntas de papel, puede ser adecuado en estudios científicos que requieren de un alta sensibilidad y/o cuando se va a realizar un examen periodontal (Niemić y cols. 2008).

## **2. Aislamiento e identificación de las especies de *Porphyromonas* y otros patógenos putativos asociados a gatos con enfermedades periodontales (Estudio 2)**

El análisis de la microbiota subgingival de 50 gatos con diferentes grados de enfermedad periodontal, con muestras tomadas con puntas de papel y procesados mediante cultivo, señalaron que *P. gulae* (86%), *P. circumdentaria* (70%) y *F. nucleatum* (90%) son frecuentemente detectadas en gatos con periodontitis, y que la frecuencia de detección y la proporción media de *T. forsythia* fue muy baja. Además, *P. gulae* era especialmente relevante debido a su alta proporción en la microbiota total (32.5%).

Al correlacionar las variables clínicas con las microbiológicas, se observó que los gatos con alta proporción de *P. gulae* mostraban más movilidad y recesión, con diferencias estadísticamente significativas, y una tendencia a mayor profundidad de bolsa y más pérdida de inserción. Al comparar gatos con menos o más de 10 años, no se encontraron diferencias significativas en términos clínicos o microbiológicos.

Estos resultados están en concordancia con lo publicado previamente. En 1988, Mallonee publicó un estudio en el que la prevalencia de *Bacteroides* negro-pigmentados se asociaba a la localización con signos de periodontitis en gatos. Otros estudios documentan altas frecuencias de detección de *Porphyromonas* spp., incluyendo *P. gulae* y *P. circumdentaria*, con porcentajes cercanos al 90% (Norris y Love 1999). Un estudio más reciente también publicó una alta prevalencia de *P. gulae*, aunque la presencia de este patógeno no fue un indicador de periodontitis en gatos, ya que se identificó en el 90% de los gatos sanos y en el 100% de los gatos con signos visibles de periodontitis (Booij-Vrieling y cols. 2010).

La importancia de las especies de *Porphyromonas* en la etiología de las enfermedades periodontales no es exclusiva de los gatos, ya que también en perros se ha observado la implicación de las bacterias anaerobias negro-pigmentadas en periodontitis (Lobprise 2006), como *O. denticanis*, *P. salivosa* y *P. gulae*. También se ha descrito la presencia de *P. gulae* en animales marsupiales, como koalas (Mikkelsen y cols. 2008).

En el Estudio 2, los gatos con alta proporción de *P. gulae* (más del 10% de la microbiota total) mostraron más movilidad y recesión, con diferencias estadísticamente significativas, y una tendencia a mayor profundidad de bolsa y más pérdida de inserción. Los gatos del Estudio 2 también presentaban recuentos significativamente altos de bacterias anaerobias, en concordancia con otros autores que relacionan la presencia de *Bacteroides* negro-pigmentados con índices gingivales altos (Mallonee y cols. 1988). Además, el análisis de regresión puede mostrar como las unidades formadoras de colonias de *P. gulae* son un predictor significativo de periodontitis (Norris y Love 1999).

La evaluación clínica del Estudio 2 no está exenta de limitaciones. La sonda periodontal usada era una sonda de presión controlada milimetrada con un grosor de 0.4 mm, que es el adecuado para el sondaje en humanos. En gatos, el surco gingival sano mide 0.5 mm (Niemić 2008), de tal forma que se puede intuir que con esta sonda milimetrada es necesario asumir un error en la medición. Sin embargo, no existen estudios que valoren la necesidad de usar una sonda específica para animales y con un diámetro menor.



*Porphyromonas* spp. (cepa UQD 409) se correlaciona positivamente con la edad en nuestro estudio, y esto difiere con otro estudio donde tanto los gatos de edades jóvenes y mayores presentan altas prevalencias de *Porphyromonas* spp. Las diferencias pueden deberse al tipo de cepa analizado.

En el Estudio 2, al comparar gatos con menos o más de 10 años, no se encontraron diferencias significativas en parámetros clínicos o microbiológicos. Esto se puede explicar debido al concepto de grupos de alto riesgo. En el pasado, se pensaba que la periodontitis se desarrollaba en pacientes con mal control de placa y gingivitis. Sin embargo, durante las últimas décadas, se ha introducido el concepto de grupos de alto riesgo. Este concepto proviene de los resultados de los estudios epidemiológicos y clínicos longitudinales que apoyan el concepto de que la periodontitis tiene un componente genético. Se sabe que la efectividad de la respuesta inmune de cada individuo, influye en la extensión de la destrucción periodontal, que puede denominarse como la susceptibilidad de un sujeto a la periodontitis (Kinane y cols. 2006). Puede sugerirse que la genética puede causar un papel similar en gatos con periodontitis, y esto puede explicar por qué los gatos jóvenes tienen mayor profundidad de bolsa y mayor pérdida de inserción. Se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

La frecuencia de detección y la proporción media de *T. forsythia* en este estudio fue muy baja (tres gatos positivos, con una prevalencia del 6% y una media de proporción de 0.26%), en contraste con otros estudios, donde se observa una prevalencia del 98% en gatos con periodontitis y del 89% en gatos sanos (Booij-Vrieling y cols. 2010). Estas diferencias se pueden explicar en el uso de diferentes estrategias microbiológicas. En el Estudio 2, las muestras microbiológicas se procesaron mediante cultivo mientras en el otro estudio (Booij-Vrieling y cols. 2010) se analizaron mediante PCR. Además, la toma de muestras en el Estudio 2 se realizó con puntas de papel de manera subgingival, mientras que Booij-Vrieling y cols. (2010) usaron torunda de algodón.

Basándonos en el Estudio 1, se pueden esperar diferencias con el uso de torunda de algodón, siendo más consistentes los resultados aportados con puntas de papel. Las diferencias en cuanto a los resultados obtenidos con PCR o cultivo se han estudiado de manera extensa. En un estudio en humanos, se comparó la detección, mediante PCR cuantitativa y cultivo, en la identificación de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y

*T. forsythia*, en 92 pacientes adultos. Los resultados indican un alto grado de congruencia para *A. actinomycescomitans* y *P. gingivalis*, aunque los recuentos de *P. gingivalis* fueron mayores con cultivo. Por el contrario, se observó que para *T. forsythia* los recuentos fueron mayores con PCR cuantitativa (Lau y cols. 2004). Esto podría explicar la baja detección de *T. forsythia* que se observa en esta investigación.

Hay otros factores a tener en cuenta al seleccionar la técnica de procesamiento microbiológica: el cultivo permite un resultado potencial más amplio, ya que los organismos específicos no están predefinidos, mientras que con PCR se predeterminan normalmente los organismos a identificar. Por lo tanto, para estudios exploratorios como el Estudio 2, el procesamiento con cultivo tiene un valor añadido.

Al estratificar los gatos según la presencia o ausencia de *P. circumdentaria*, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, un estudio previo mostró como predictor significativo del estatus de periodontitis a las unidades formadoras de colonias de *P. circumdentaria*. También en este caso las diferencias se pueden deber a las diferentes estrategias metodológicas. La periodontitis se clasificó con un índice de 0 a 6, evaluado en el canino maxilar derecho y el tercer premolar, y los datos se analizaron con un análisis de regresión entre las unidades formadoras de colonias de *P. circumdentaria* y el nivel de periodontitis (Norris Love 1999). En cambio, en el Estudio 2 se compararon los grupos con presencia o ausencia de este patógeno y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Nuestros resultados sugieren que el papel patogénico de *P. circumdentaria* es menos importante que *P. gulae* en las enfermedades periodontales en gatos.

### **3. Identificación molecular de bacterias negro-pigmentadas de muestras subgingivales en gatos que padecen enfermedades periodontales (Estudio 3)**

En el Estudio 3 se observó, con el método microbiológico diagnóstico molecular de clonación y analizando la secuencia del gen 16S rARN, la presencia de siete microorganismos negro-pigmentados en gatos que padecen periodontitis, que corresponden a *P. gulae*, y a las especies filogenéticamente similares *O. denticanis* y *P. circumdentaria*.

Estos resultados están en congruencia con los resultados publicados por otros grupos en estudios similares, donde se evalúan muestras microbiológicas supragingivales de gatos con periodontitis y muestran altas frecuencias de detección de *Porphyromonas* spp. (alrededor del 90%), incluyendo *P. gulae* y *P. circumdentaria* (Norris y Love 1999). En un estudio más reciente también se publicó una alta prevalencia de *P. gulae* en gatos con enfermedad periodontal (Booij-Vrieling y cols. 2010). Los resultados obtenidos sostienen la identificación de *P. circumdentaria*, *P. salivosa* y *P. gulae* como especies bacterianas asociadas significativamente con las enfermedades periodontales en gatos (Mallonee y cols. 1988; Norris y Love 2001).

Los resultados del Estudio 3 muestran la presencia de *O. denticanis* en gatos con periodontitis, y estos resultados están en concordancia con otros estudios, donde se asocia este patógeno con la enfermedad periodontal en perros, al ser aislado en bolsas periodontales en perros con periodontitis (Lobprise 2006; Hardham y cols. 2008). También avalan estos hallazgos un modelo experimental sobre ratones, donde se inocularon tanto *P. gulae* como *O. denticanis*, y tras 42 días se midió la pérdida ósea alveolar. Los resultados mostraron como *O. denticanis* producía la misma o mayor pérdida ósea que *P. gulae*, siendo la pérdida asociada a ambos patógenos significativamente mayor comparada con la del control negativo. Esto sugiere que *O. denticanis* puede ser un patógeno relevante en la etiología de la periodontitis en animales de compañía (Hardham y cols. 2008).

El uso de análisis de restricción (ARDRA) permitió el estudio de los aislamientos amplificados con PCR y la identificación correcta de los patrones filogenéticos (PF), ya que algunos patrones (PF 1 y PF 2) resultaron con el mismo número y con las mismas bandas de distribución con el uso de una enzima de restricción, *RsaI*, aunque resultaron en clara diferencia cuando se usó otra enzima, *MsaI*. De esa forma, se confirmó que las especies eran filogenéticamente muy cercanas.

Fournier y cols. (2001), usando una metodología similar, propone *P. gulae* como una nueva especie bacteriana en la taxonomía general. Estos autores, primero aislaron las especies en cultivo, obtenidas de muestras del surco gingival de varios animales, incluyendo gatos, y secuenciaron la especie con técnicas moleculares usando el gen 16S rARN. Se demuestra que, a pesar de que la morfología es similar a la de *P. gingivalis* de

origen humano, existen suficientes diferencias en el gen 16S rARN para justificar la existencia de una nueva especie de *Porphyromonas*, denominada *P. gulae*.

Al comparar los resultados obtenidos en el Estudio 3, usando técnicas moleculares, y los obtenidos en el Estudio 2, donde se identificaron las bacterias con métodos bioquímicos, se obtuvo una alta congruencia en la identificación de colonias denominadas como *P. gingivalis-similar*. Lo contrario ocurrió en la identificación de colonias de *P. intermedia-similar*, donde las diferencias fueron notables.

Otro resultado relevante es que con el uso de técnicas moleculares se encontraron siete perfiles filogenéticos diferentes, mientras que con los test bioquímicos sólo se observaron dos tipos diferentes de colonias.

#### **4. Implicaciones de los nuevos conocimientos sobre la microbiota subgingival asociada a enfermedades periodontales en gatos**

Existe suficiente evidencia sobre el papel de las bacterias negro-pigmentadas en la periodontitis en humanos, ya que estas especies han sido asociadas con las formas severas de periodontitis, sobretudo *P. gingivalis* y altos recuentos de *P. intermedia* (Winkel y cols. 1998). De la misma manera, la literatura que existe acerca de la etiología de la periodontitis en gatos, se centra en su mayoría en las especies de *Porphyromonas* spp. siendo *P. gulae* el patógeno más estudiado, junto con *P. circumdentaria* y *P. salivosa* (Norris y Love 1999, 2000, 2001). Sin embargo, probablemente existen otros patógenos implicados en las enfermedades periodontales en gatos, como *O. denticanis*, identificado en el Estudio 3 mediante técnicas moleculares, o *P. crevioricanis* y *F. russi*, aislados en gatos con periodontitis (Khazandi y cols. 2014), que puede ser necesario estudiar para entender la etiopatogenia de estas enfermedades.

Los estudios de intervención en humanos, que usan desbridamiento radicular mecánico convencional, muestran que estos patógenos, en concreto *P. gingivalis*, son difíciles de eliminar de la microbiota subgingival, y como consecuencia se limitan los resultados en cuanto a las variables clínicas (Renvert y cols. 1990; Mombelli y cols. 2000). De manera que en algunos casos de periodontitis avanzadas, agresivas y refractarias, el uso de antibióticos estaría justificado, para eliminar los patógenos en los que el tratamiento

mecánico no es suficiente (Herrera y cols. 2008). Las enfermedades periodontales en gatos es una de las enfermedades en las que se requiere el uso de antibióticos de manera frecuente (Khazandi y cols. 2014). Por lo tanto, es importante conocer los patógenos implicados en la etiología de estas enfermedades en gatos, de manera que se puedan mejorar las estrategias, tanto preventivas como terapéuticas, en las enfermedades periodontales en estos animales. Además es importante tener en cuenta que las bacterias periodonto-patógenas en gatos pueden actuar como reservorio (Booij-Vrieling y cols. 2010) y vector de infección a humanos.

No sólo en humanos se ha asociado a las enfermedades periodontales como factor de riesgo para algunas condiciones sistémicas (Joshipura y cols. 1996; Grossi y cols. 1997; Hill 1998; Offenbacher y cols. 1999; Beck y Offenbacher 2005), sino que también en perros se han observado cambios histológicos en múltiples órganos, como los riñones, hígado y el tejido miocárdico, asociados a las enfermedades periodontales. Con ello, se ha demostrado una asociación entre la severidad de las enfermedades periodontales y el aumento de los cambios histológicos en los órganos mencionados (DeBowes y cols. 1996; DeBowes 1998). Por analogía, se puede concluir que en gatos, la exposición crónica a los periodonto-patógenos puede agravar o favorecer algunas condiciones sistémicas, por lo que la afectación general no solo se limitaría a la ya conocida dificultad en la alimentación y empeoramiento del estado general de estos animales de compañía.

Se necesitan más estudios que evalúen la microbiota subgingival periodonto-patógena en gatos, ampliando las bacterias diana, para identificar otras bacterias putativas implicadas en la etiopatogénesis de las enfermedades periodontales.



## CONCLUSIONES

- Los estudios realizados confirman la importancia etiológica de las especies bacterianas negro-pigmentadas, principalmente *Porphyromonas gulae*, en las enfermedades periodontales en gatos.
- La estrategia de toma muestras, insertando puntas de papel de manera subgingival, mejora el recuento de bacterias periodonto-patógenas asociadas a la enfermedad periodontal en gatos, respecto a la técnica habitual con torunda de algodón.
- *P. gulae* se confirma como el patógeno más relevante en enfermedad periodontal en gatos, por su alta frecuencia de detección (43 de 50), por representar elevadas proporciones de la flora anaerobia cultivada (32.5%), y por que los gatos con altas proporciones de *P. gulae* (más del 10%) presentaban mayor severidad en la periodontitis, de manera estadísticamente significativa.
- La identificación de los microorganismos específicos aislados en gatos que padecen periodontitis, usando técnicas moleculares, demostró la presencia de *P. gulae* y de especies filogenéticamente muy cercanas, como *Odoribacter denticanis* y *Porphyromonas circumdentaria*.





## REFERENCIAS

- Allaker, R. P. (2002) Serum inhibition of *Porphyromonas gingivalis* protease in the dog, cat and sheep--a preliminary study. *The Veterinary Journal* **163**, 99-101.
- Baca Garcia, P., Llodra Calvo, J.C., Gonzalez Jaranay, M., Carroquino Canas, R., Fernandez Ortega, C.M. (1989) Results of an oral hygiene education campaign in a group of soldiers in two Granada garrisons. *Revista Europea de Odontoestomatología* **1**, 321-326.
- Baelum, V., Fejerskov, O., Manji, F. (1988) Periodontal diseases in adult Kenyans. *Journal of Clinical Periodontology* **15**, 445-452.
- Beck, J. D., Koch, G. G., Rozier, R. G., Tudor, G. E. (1990) Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *Journal of Periodontology* **61**, 521-528.
- Beck, J. D., Koch, G. G., Zambon, J. J., Genco, R. J., Tudor, G. E. (1992) Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *Journal of Periodontology* **63**, 93-99.
- Beck, J. D., Offenbacher, S. (2005) Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of Periodontology* **76**, 2089-2100.
- Boles, B. R., Thoendel, M., Singh, P. K. (2004) Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **101**, 16630-16635.
- Booij-Vrieling, H. E., van der Reijden, W. A., Houwers, D. J., de Wit, W. E., Bosch-Tijhof, C. J., Penning, L. C., van Winkelhoff, A. J., Hazewinkel, H. A. (2010) Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. *Veterinary Microbiology* **144**, 147-152.
- Bravo Perez, M., Casals Peidro, E., Cortes Martinicorena, F., Llodra Calvo, J. (2006) Encuesta de salud oral en España 2005. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España* **11**, 409-456.
- Boyce, E. N., Ching, R. J., Logan, E. I., Hunt, J. H., Maseman, D. C., Gaeddert, K. L., King, C. T., Reid, E. E., Hefferren, J. J. (1995) Occurrence of gram-negative black-pigmented anaerobes in subgingival plaque during the development of canine periodontal disease. *Clinical Infectious Disease* **20 Suppl 2**, S317-319.
- Burdon, K.L. (1928) *Bacterium melaninogenicum* from normal and pathologic tissues. *Journal of Infectious Diseases* **42**, 161-171.
- Casas, A., Herrera, D., Martín-Carnes, J., Gonzalez, I., O'Connor, A., Sanz, M. (2007) Influence of sampling strategy on microbiologic results before and after periodontal treatment. *Journal of Periodontology* **78**, 1103-1112.
- Cave, N. J., Bridges, J. P., Thomas, D. G. (2012) Systemic effects of periodontal disease in cats. *Veterinary Quarterly* **32**, 131-144.
- Conrads, G., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., Horz, H. P., Goldstein, E. J. (2005) 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Porphyromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 607-613.

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**, 711-745.
- Cugini, C., Klepac-Ceraj, V., Rackaityte, E., Riggs, J. E., Davey, M. E. (2013) *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *Journal of Oral Microbiology* **5**.
- DeBowes, L. J., Mosier, D., Logan, E., Harvey, C. E., Lowry, S., Richardson, D. C. (1996) Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. *Journal of Veterinary Dentistry* **13**, 57-60.
- DeBowes, L. J. (1998) The effects of dental disease on systemic disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **28**, 1057-1062.
- Do, M. J., Kim, K., Lee, H., Cha, S., Seo, T., Park, H. J., Lee, J. S., Kim, T. I. (2013) Development of animal experimental periodontitis models. *Journal of Periodontal and Implant Science* **43**, 147-152.
- Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Thornton-Evans, G. O., Genco, R. J. (2012) Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of Dental Research* **91**, 914-920.
- Feng, X., Zhang, L., Xu, L., Meng, H., Lu, R., Chen, Z., Shi, D., Wang, X. (2014) Detection of eight periodontal microorganisms and distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Chinese patients with aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **85**, 150-159.
- Flemmig, T. F. (1999) Periodontitis. *Annals of Periodontology* **4**, 32-38.
- Fournier, D., Mouton, C., Lapierre, P., Kato, T., Okuda, K., Menard, C. (2001) *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1179-1189.
- Grimont, F., Grimont, P. A. (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie* **137B**, 165-175.
- Grossi, S. G., Skrepicki, F. B., DeCaro, T., Robertson, D. C., Ho, A. W., Dunford, R. G., Genco, R. J. (1997) Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *Journal of Periodontology* **68**, 713-719.
- Grossi, S. G., Zambon, J. J., Ho, A. W., Koch, G., Dunford, R. G., Machtei, E. E., Norderyd, O. M., Genco, R. J. (1994) Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology* **65**, 260-267.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* **5**, 78-111.
- Hardham, J. M., King, K. W., Dreier, K., Wong, J., Strietzel, C., Eversole, R. R., Sfintescu, C., Evans, R. T. (2008) Transfer of *Bacteroides splanchnicus* to *Odoribacter* gen. nov. as *Odoribacter splanchnicus* comb. nov., and description of *Odoribacter denticanis* sp. nov., isolated from the crevicular spaces of canine periodontitis patients. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **58**, 103-109.

- Harvey, C. E., Thornsberry, C., Miller, B. R. (1995) Subgingival bacteria--comparison of culture results in dogs and cats with gingivitis. *Journal of Veterinary Dentistry* **12**, 147-150.
- Harvey, C. E., Harvey, C. E., Thornsberry, C., Miller, B. R. (2005) Management of periodontal disease: understanding the options. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* **31**: 819-836.
- Herrera, D., Roldan, S., Gonzalez, I., Sanz, M. (2000a) The periodontal abscess (I). Clinical and microbiological findings. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 387-394.
- Herrera, D., Roldan, S., Sanz, M. (2000b) The periodontal abscess: a review. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 377-386.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E., Leon, R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 106-113.
- Hill, G. B. (1998) Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. *Annals of Periodontology* **3**, 222-232.
- Hoshuyama, S., Kanoe, M., Amimoto, A. (1996) Isolation of obligate and facultative anaerobic bacteria from feline subcutaneous abscesses. *The Journal of Veterinary Medical Science* **58**, 273-274.
- Hudspeth, M. K., Hunt Gerardo, S., Maiden, M. F., Citron, D. M., Goldstein, E. J. (1999) Characterization of *Bacteroides forsythus* strains from cat and dog bite wounds in humans and comparison with monkey and human oral strains. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2003-2006.
- Joshiyura, K. J., Rimm, E. B., Douglass, C. W., Trichopoulos, D., Ascherio, A., Willett, W. C. (1996) Poor oral health and coronary heart disease. *Journal of Dental Research* **75**, 1631-1636.
- Khazandi, M., Bird, P. S., Owens, J., Wilson, G., Meyer, J. N., Trott, D. J. (2014) In vitro efficacy of cefovecin against anaerobic bacteria isolated from subgingival plaque of dogs and cats with periodontal disease. *Anaerobe* **28**, 104-108.
- Kinane, D. F., Peterson, M., Stathopoulou, P. G. (2006) Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontology 2000* **40**, 107-119.
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S., Palmer, R. J., Jr. (2002) Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 486-505.
- Konig, J., Holtfreter, B., Kocher, T. (2010) Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services--position paper 1. *European Journal of Dental Education* **14 Suppl 1**, 4-24.
- Kornman, K. S., Page, R. C., Tonetti, M. S. (1997) The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000* **14**, 33-53.
- Laliberte, M., Mayrand, D. (1983) Characterization of black-pigmented *Bacteroides* strains isolated from animals. *Journal of Applied Bacteriology* **55**, 247-252.

- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martin, C., Silva, A. (2004) Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 1061-1069.
- Lindhe, J., Nyman, S. (1975) The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *Journal of Clinical Periodontology* **2**, 67-79.
- Llodra Calvo, J. C., Oliver, A., Montserrat Ingles Novell, M., Villa, A. (2012) [Contributions and perspectives of the multiprofessional team to the health basket in primary care. SESPAS report 2012]. *Gaceta Sanitaria* **26 Suppl 1**, 118-123.
- Lobprise, H. B., Wiggs, R. B., Peak, R. M. (1999) Dental diseases of puppies and kittens. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **29**, 871-893.
- Lobprise, H. (2006) Canine periodontitis: isolation and identification of periodontopathogens and initial evaluation of a bacteria. Proceedings of the 15th European Congress of Veterinary Dentistry. Cambridge, UK, September 7 to 9, 2006. pp 66-67.
- Loesche, W. J., Syed, S. A., Laughon, B. E., Stoll, J. (1982) The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Journal of Periodontology* **53**, 223-230.
- Lopez, N. J. (2000) Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **71**, 948-954.
- Love, D. N., Redwin, J., Norris, J. M. (2002a) Cloning and expression of the superoxide dismutase gene of the feline strain of *Porphyromonas gingivalis*: immunological recognition of the protein by cats with periodontal disease. *Veterinary Microbiology* **86**, 245-256.
- Macdonald, J. B., Gibbons, R. J., Socransky, S. S. (1960) Bacterial mechanisms in periodontal disease. *Annals of the N Y Academy of Sciences* **85**, 467-478.
- Machtei, E. E., Hausmann, E., Grossi, S. G., Dunford, R., Genco, R. J. (1997) The relationship between radiographic and clinical changes in the periodontium. *Journal of Periodontal Research* **32**, 661-666.
- Mallonee, D. H., Harvey, C. E., Venner, M., Hammond, B. F. (1988) Bacteriology of periodontal disease in the cat. *Archives of Oral Biology* **33**, 677-683.
- Mikkelsen, D., Milinovich, G. J., Burrell, P. C., Huynh, S. C., Pettett, L. M., Blackall, L. L., Trott, D. J., Bird, P. S. (2008) Phylogenetic analysis of *Porphyromonas* species isolated from the oral cavity of Australian marsupials. *Environmental Microbiology* **10**, 2425-2432.
- Mombelli, A., Schmid, B., Rutar, A., Lang, N. P. (2000) Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and

- Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *Journal of Periodontology* **71**, 14-21.
- Mota, R. M., Moreira, J. L., Souza, M. R., Horta, M. F., Teixeira, S. M., Neumann, E., Nicoli, J. R., Nunes, A. C. (2006) Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnology* **6**, 2.
- Niemiec, B. A. (2008) Periodontal therapy. *Topics in Companion Animal Medicine* **23**, 81-90.
- Nieves, M.A., Hartwig, P., Kinyin, J. M., Riedesel D.H. (1997) Bacterial isolates from plaque and from blood during and after routine dental procedures in dogs. *Veterinary Surgery* **26**: 26-32.
- Norris, J. M., Love, D. N., Norris, J. M., Love, D. N. (1999) Associations amongst three feline *Porphyromonas* species from the gingival margin of cats during periodontal health and disease *Veterinary Microbiology* **65**, 195-207.
- Norris, J. M., Love, D. N., Norris, J. M., Love, D. N., Norris, J. M., Love, D. N. (2000a) The association of two recombinant proteinases of a feline strain of *Porphyromonas gingivalis* with periodontal disease in cats. *Veterinary Microbiology* **71**, 69-80.
- Norris, J. M., Love, D. N. (2000b) Serum antibody responses of cats to soluble whole cell antigens of feline *Porphyromonas gingivalis*. *Veterinary Microbiology* **73**: 37-49
- Norris, J. M., Love, D. N. (2001) Serum antibody responses of cats to soluble whole cell antigens and isolated fimbriae of feline *Porphyromonas salivosa (macacae)* and associations with periodontal disease. *Veterinary Microbiology* **79**: 225-237
- Offenbacher, S., Madianos, P. N., Champagne, C. M., Southerland, J. H., Paquette, D. W., Williams, R. C., Slade, G., Beck, J. D. (1999) Periodontitis-atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. *Journal of Periodontal Research* **34**, 346-352.
- Page, R.C. (1998) The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Annals of Periodontology* **3**, 108-120.
- Parent, R., Mouton, C., Lamonde, L., Bouchard, D. (1986) Human and animal serotypes of *Bacteroides gingivalis* defined by crossed immunoelectrophoresis. *Infection and Immunity* **51**, 909-918.
- Perez-Salcedo, L., Herrera, D., Esteban-Saltiveri, D., Leon, R., Jeusette, I., Torre, C., O'Connor, A., Gonzalez, I., Sanz, M. (2011) Comparison of two sampling methods for microbiological evaluation of periodontal disease in cats. *Veterinary Microbiology* **149**: 500-503
- Perez-Salcedo, L., Herrera, D., Esteban-Saltiveri, D., Leon, R., Jeusette, I., Torre, C., O'Connor, A., Gonzalez, I., Gonzalez, I. (2013) Isolation and identification of *Porphyromonas* spp. and other putative pathogens from cats with periodontal disease. *Journal of Veterinary Dentistry* **30**, 208-213.
- Perez-Salcedo, L., Laguna, E., Sanchez, M. C., Marin, M. J., O'Connor, A., Gonzalez, I., Sanz, M., Herrera, D. (2015) Molecular identification of black-pigmented

- bacteria from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease  
*Journal of Small Animal Practice* **56**, 270-275.
- Perry, R., Tutt, C. (2015) Periodontal disease in cats: back to basics--with an eye on the future. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **17**, 45-65.
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J., Egelberg, J. (1990) Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 345-350.
- Riggio, M. P., Lennon, A., Rolph, H. J., Hodge, P. J., Donaldson, A., Maxwell, A. J., Bagg, J. (2008) Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis. *Oral Disease* **14**, 251-258.
- Rudney, J. D., Chen, R. & Sedgewick, G. J. (2001) Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infection and Immunity* **69**, 2700-2707.
- Rudney, J. D., Larson, C. J. (1994) Use of restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes to assign species to unknown clinical isolates of oral viridans streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 437-443.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M. & Silva, A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 1034-1047.
- Schlegel, L., Grimont, F., Grimont, P. A., Bouvet, A. (2003) Identification of major Streptococcal species by rrn-amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 657-666.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28**, 12-55.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-144.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Goodson, J. M., Lindhe, J. (1984) New concepts of destructive periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **11**, 21-32.
- Tanner, A., Kent, R., Maiden, M. F., Taubman, M. A. (1996) Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *Journal of Periodontal Research* **31**, 195-204.
- van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A., van der Velden, U. (2002) *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 1023-1028.
- van Winkelhoff, A. J., van Steenberghe, T. J., de Graaff, J. (1988) The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *Journal of Clinical Periodontology* **15**, 145-155.

Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J., van der Velden, U. (1998) Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 857-864.





## ANEXO: RESUMEN EN INGLÉS

### EVALUATION OF THE SUBGINGIVAL MICROBIOTA IN CATS AND ITS ASSOCIATION WITH PERIODONTAL DISEASES

#### ABSTRACT

**Background:** Periodontal diseases are very common conditions in cats and their prevalence have been reported as affecting up to 70% of cats between 20 and 27 months old, and up to 85% of cats older than 6 years. The typical signs and symptoms of these conditions include gingival inflammation and bleeding, visible plaque accumulation, calculus, halitosis, gingival recession, periodontal pocket formation and mobile teeth. This condition usually progresses slowly and occasionally makes the animals reluctant to eat or drink properly, thus having the potential for impacting general health and wellbeing.

In humans, there is no doubt concerning the infectious nature of periodontal diseases and the aetiological importance of the colonization by specific bacteria of the subgingival biofilm. Among these putative pathogens, the role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections has been widely studied and the importance of *Porphyromonas gingivalis* as a significant risk indicator for the initiation and progression of periodontitis in humans has been well established.

In cats, however, information on the microbiology of periodontal diseases is relatively scarce, although most published studies also point out the importance of black-pigmented bacterial species. Greater proportions of these pathogens have been found associated with increased severity of periodontal diseases in cats.

The most studied genera in feline periodontal diseases are *Porphyromonas* spp. The presence of *Porphyromonas* spp. and their increased prevalence have been also associated with periodontal diseases and its severity.

*Porphyromonas gulae* is a relatively new species isolated from the gingival sulcus of various animal hosts, being different from the related strains of *P. gingivalis* in humans. In addition to *P. gulae*, two other *Porphyromonas* spp. have been studied in cats: *Porphyromonas circumdentaria* and *Porphyromonas salivosa*, both associated with periodontal diseases.

The distinction between *P. gingivalis* and *P. gulae* has been possible due to molecular-based technology, although most studies have used culture and biochemical test to identify these bacterial pathogens in the microbiota of cats.

In light of the relevance of periodontal disease for cat health and wellbeing and the likely aetiological importance of these pathogens, both in terms of their relative presence in the subgingival microbiota or as a reservoir of periodontal pathogens and possible vector for human oral infections, the study of these bacteria in cats is very relevant.

**Objective:** The main objective of this series of investigations was to evaluate the subgingival microbiota of cats and determine the most prevalent periodontal pathogens implicated in feline periodontal diseases, as well as validating the microbiological approaches used in humans.

## **Methods. Results**

In **Study 1**, a pilot study was designed, where the objective was to compare two microbiological sampling approaches for the evaluation of the periodontal disease-associated microbiota in cats. Ten cats were clinically evaluated and sampled under sedation. Subgingival pooled samples were collected from four sites, one per quadrant. The sites were selected based on probing depth, the presence of bleeding and the ease of access. In parallel, samples were obtained with cotton swabs, after removal of excess of saliva; a sterile cotton bacteriological swab, moistened with reduced fluid transport (RTF), was rubbed firmly over the gingival margin and the surface of the upper right canine of each cat, about 20 times. Samples were transferred to a vial containing RTF and transported to the laboratory within 24 hours; where samples were cultured on blood agar and DentaId-1 media, and a specific medium for *Bartonella henselae*.

The results demonstrated significantly higher counts with paper points than with cotton swabs. Moreover, the use of paper points increased the frequency of detection for *P. gulae*, reducing false negatives; and a similar tendency was observed for the other pathogenic species evaluated. In addition, the proportion of total flora for *P. gulae* and *P. circumdentaria* were also higher with subgingival sampling.

In **Study 2**, an additional group of 40 cats were evaluated (totalling 50 cats with those of the previous study), and a clinical exam and microbiological samples with the

subgingival approach were performed; with the objective of evaluating the subgingival microbiota and determining the most prevalent periodontal pathogens implicated in feline periodontal diseases, and correlate these findings with the clinical periodontal status. The periodontal clinical exam was performed at 3 teeth in each quadrant, with the registration of probing pocket depth, recession, tooth mobility and gingival, calculus, calculus thickness, plaque and plaque thickness indices.

The results demonstrated that three bacterial species were frequently detected: *P. gulae* (86%), *P. circumdentaria* (70%) y *Fusobacterium nucleatum* (90%). The mean proportion of total microflora was high for *P. gulae* (32.5%), moderate for *P. circumdentaria* (8.82%) and low for *F. nucleatum* (3.96%). Between clinical variables, tooth mobility was correlated to recession, probing pocket depth, clinical attachment level, gingival and calculus indexes, and also with total bacterial counts. Cats with more than 10% of *P. gulae* showed significantly more mobility and gingival recession, and a tendency for deeper probing depths and larger attachment loss.

In **Study 3**, the black-pigmented bacterial species found in the subgingival samples of cats with periodontal disease were characterised, using molecular-based microbiological techniques. Sixty-five subgingival samples obtained from 50 cats were analysed by polymerase chain reaction (PCR).

The results showed eight phylogenetic profiles: *P. gulae* (40%), *P. gingivalis*/*P. gulae* (36.9%), *P. gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 406 (9.2%), *Odoribacter denticanis* (6.2%), *P. gulae*/*Porphyromonas* sp. UQD 348 (1.5%) and *P. circumdentaria* (1.5%). From the 65 isolates of black-pigmented bacteria, only two different bacteria genera were identified: *Porphyromonas* spp. that corresponded to 93.5% of all strains, and *Odoribacter* spp. with a prevalence of 6.5%.

When compared with the species resulting from biochemical diagnosis, the identification of *P. gulae* was congruent in 70% of the cases, while colonies identified as *P. intermedia*-like corresponded in 80% of the cases to *P. gulae*.

### **Conclusions:**

The results of this series of studies confirmed that black-pigmented bacterial species are relevant pathogens in the aetiology of periodontal diseases in cats, mainly *Porphyromonas gulae*.

The subgingival sampling approach with paper points improved the recovery of periodontal pathogens, associated with periodontal disease in cats, compared with cotton swabs; higher frequency of detection and high recoveries of anaerobic bacteria of *P. gulae* were observed; and finally molecular-based technology demonstrated the presence of *P. gulae* and the phylogenetically related species such as *O. denticanis* and *P. circumdentaria*.

**Key words:** Periodontal disease, cats, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas circumdentaria*, microbiological sample, culture, PCR.